



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 41 43 214 A 1**

51 Int. Cl.⁵:
C 07 K 15/28
A 61 K 39/395

21 Aktenzeichen: P 41 43 214.2
22 Anmeldetag: 30. 12. 91
43 Offenlegungstag: 28. 1. 93

DE 41 43 214 A 1

30 Innere Priorität: 32 33 31
25.07.91 DE 41 24 759.0

71 Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, DE

74 Vertreter:
Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys.
Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B.,
Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel,
J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000
München

72 Erfinder:
Weidle, Ulrich, Dr., 8000 München, DE; Scheuer,
Werner, Dr., 8122 Penzberg, DE; Kaluza, Brigitte, Dr.,
8173 Bad Heilbrunn, DE; Riethmüller, Gert, Prof. Dr.,
8000 München, DE

54 Synergistisch wirkende Antikörperzusammensetzung

57 Die vorliegende Erfindung betrifft eine synergistisch wirkende Antikörperzusammensetzung zur Verbesserung der Immunsuppression, die
(a) mindestens einen für sich alleine bereits stark inhibierenden monoklonalen Anti-CD4-Antikörper und
(b) mindestens einen für sich alleine bereits stark inhibierenden monoklonalen Anti-IL2R α - oder Anti-IL2R β -Antikörper enthält sowie ein auf dieser Antikörperzusammensetzung basierendes Arzneimittel.

DE 41 43 214 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft eine synergistisch wirkende Antikörperzusammensetzung zur Verbesserung der Immunsuppression, die zwei Antikörper gegen verschiedene T-Zell-Oberflächenmarker enthält.

In der Transplantationschirurgie sind in den letzten zehn Jahren deutliche Fortschritte erzielt worden. Insbesondere haben sich die therapeutischen Maßnahmen, welche die Funktion und die Überlebenszeit des transplantierten Organs sicherstellen sollen, wesentlich verbessert. Trotz dieser positiven Entwicklung gewähren die heute etablierten Maßnahmen auch für einen begrenzten Zeitraum keinen hundertprozentigen Transplantationserfolg. Dies liegt zum einen an der Qualität des zu transplantierenden Organs und der Operationstechnik, zum großen Teil jedoch daran, daß die Spenderorgane von einem genetisch differenten Individuum stammen. Diese genetische Inkompatibilität zwischen Empfänger und Spender (allogenes Transplantat) verursacht im Empfänger eine Immunreaktion gegen Major Histocompatibility Complex (MHC)-kodierte Oberflächenantigene des Transplantats. Zur Verhinderung dieser Abstoßungsreaktion, die sowohl akut als auch chronisch verlaufen kann, muß die immunologische Reaktivität des Empfängers gezielt durch eine immunsuppressive Therapie unterdrückt werden. Alle heute in der Klinik verwendeten Immunsuppressiva bewirken jedoch eine mehr oder weniger unspezifische Immunsuppression. Die daraus resultierenden Nebenwirkungen sind zum Teil gravierend.

So wirkt das Purinanalogen Azathioprin (Drug Evaluation, 6th Edition American Medical Association 1151 (1986)) als Antimetabolit auf alle proliferierenden Zellen. Nachteile dieser Substanz sind jedoch ihre potentielle Lebertoxizität und die Induktion einer Knochenmarksdepression. Dadurch kommt es zur Verminderung aller Blutzellen.

Glucokortikoide gehören zu den nichtcytotoxischen Immunsuppressiva. Sie führen jedoch insbesondere bei einer längeren Therapiedauer zu nicht tolerablen Nebenwirkungen (Wachstumsstörungen, Hypertonie, Herzinsuffizienz), die zur Absetzung der Medikation zwingen.

Anti-Lymphozyten-Globulin (ALG) und Cyclosporin besitzen eine höhere Spezifität als die zuvor genannten Substanzen, wirken jedoch auf die Gesamtheit des Immunsystems und erhöhen durch diese generelle Immunsuppression das Risiko von Virus- und Bakterieninfektionen. Weitere Nachteile sind, daß ALG aufgrund seines Sensibilisierungspotentials nur zeitlich befristet verabreicht werden kann. Die Behandlung mit Cyclosporin kann zu einer erhöhten Tumorzinzidenz führen.

Akute Abstoßungskrisen bei Organtransplantationen konnten auch erfolgreich mit Anti-T-Zell-Antikörpern behandelt werden (Cosimi AB: Transplant.Proc. 15 (1983), S. 1889; Kreis, H. et al., Transplant.Proc. 17 (1985), S. 1315; Krikma, R.L. et al., Transplantation 36 (1983), S. 620). T-Zellen (T-Lymphozyten) werden in CD4-positive und CD8-positive Zellen unterteilt. CD4 und CD8 sind Oberflächenantigene auf diesen Zellen. CD8-positive T-Zellen interagieren mit dem T-Zell-Rezeptor in Kontext mit MHC Klasse I Molekülen (Killerzellen). CD4-positive T-Zellen interagieren mit dem T-Zell-Rezeptor in Kontext mit MHC Klasse II Molekülen auf entsprechenden Rezipientenzellen (Helfer-T-Zellen, Suppressor T-Zellen).

Es wurde gezeigt, daß sowohl mit Anti-CD4-Antikör-

pern als auch mit Anti-CD8-Antikörpern die Abstoßungsreaktion bei Organtransplantationen verhindert werden kann (vgl. z. B. Benjamin, R.J. and Waldmann, H.: Induction of tolerance by monoclonal antibody therapy, Nature 320 (1986), S. 449; Benjamin, R.J., Cobbold, S.P., Clark, M.P. and Waldmann, H.: Tolerance to rat monoclonal antibodies. Implications for serotherapy. J.Exp.Med. 163 (1986), S. 1539; Cobbold, S.P., Martin, G., Quin S.X. and Waldmann, H.: Monoclonal antibodies to promote marrow engraftment and tissue graft tolerance. Nature 323 (1986), S. 164; Quin S.X., Cobbold, S.P., Tighe, H., Benjamin, R. and Waldmann, H.: CD4 Mab pairs for immunosuppression and tolerance induction. Eur.J.Immunol. 18 (1987) S. 495).

Der Nachteil bei der immunsuppressiven Behandlung mit derartigen Antikörpern ist jedoch, daß diese in einer relativ großen Menge eingesetzt werden müssen. Damit kann es selbst bei chimärisierten Antikörpern zu heftigen Immunreaktionen kommen.

Die EP-A 02 40 344 offenbart in Beispiel 5 (Spalte 8) eine Kombination von Anti-CD4-MAKs mit Anti-IL2 α (CD25)-MAKs zur Verhinderung von Transplantatabstoßungen. Eine vollständige Hemmung wird jedoch nur bei Kombination mit einem dritten MAK gegen CD8 erreicht. Der in der Kombination als Anti-IL2 α -MAK verwendete Antikörper YCTLD45.1 zeigt für sich alleine keine nennenswerte Hemmung der Immunreaktion. Es wird jedoch nicht offenbart, welche Eigenschaften die in Kombination verwendbaren Antikörper besitzen müssen, damit generell eine vollständige Hemmung erwartet werden kann.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht somit darin, ein immunsuppressives Mittel zur Verfügung zu stellen, welches zuverlässig die Abstoßungsreaktion gegen Transplantate unterdrücken kann und nur in geringen Dosen verabreicht werden muß.

Gelöst wird die erfindungsgemäße Aufgabe durch eine synergistisch wirkende Antikörperzusammensetzung zur Verbesserung der Immunsuppression, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß sie

- a) mindestens einen für sich alleine bereits stark inhibierenden monoklonalen Anti-CD4-Antikörper und
- b) mindestens einen für sich alleine bereits stark inhibierenden monoklonalen Anti-IL2 α - oder Anti-IL2 β -Antikörper enthält,

wobei ein stark inhibierender Antikörper bei einer Konzentration von 10 000 ng/ml die allogen induzierte Lymphozytenproliferation in Abwesenheit anderer Antikörper zu mindestens 40% hemmt.

Wenn es sich bei dem Antikörper (b) um einen Anti-IL2 α -Antikörper handelt, dann liegt das molare Verhältnis der Antikörper (a) und (b) vorzugsweise zwischen 1:10 und 10:1. Wenn es sich dagegen bei dem Antikörper (b) um einen Anti-IL2 β -Antikörper handelt, dann liegt das molare Verhältnis der Antikörper (a) und (b) vorzugsweise zwischen 1:1000 und 10:1. Die Kombination Anti-CD4-MAK und Anti-IL2 α -MAK ist erfindungsgemäß bevorzugt.

Eine Voraussetzung für den synergistischen Effekt bei der Kombination von monoklonalen Anti-CD4-bzw. Anti-IL2-Rezeptor-Antikörpern ist, daß jeder dieser Antikörper bereits für sich alleine eine immunsuppressive, d. h. die Lymphozytenproliferation stark inhibierende Wirkung zeigen muß. Diese "stark inhibierende" Wirkung im Sinne der vorliegenden Erfindung zeigt sich

darin, daß der betreffende Antikörper bereits alleine die allogen induzierte Lymphozytenproliferation (MLR) bei einer Konzentration von 10 000 ng/ml zu mindestens 40% hemmt. Antikörper, die in einer Konzentration von 10 000 ng/ml bei der MLR keine Hemmwirkung oder eine Hemmwirkung von weniger als 40% zeigen, sind daher als Bestandteile einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung im allgemeinen nicht geeignet.

Es wurde gefunden, daß die Kombination eines stark inhibierenden monoklonalen Antikörpers gegen die CD4-Struktur mit einem stark inhibierenden monoklonalen Antikörper gegen die α -Kette des IL2-Rezeptors (Anti-IL2R α -Antikörper) oder die β -Kette des IL2-Rezeptors (Anti-IL2R β -Antikörper) überraschenderweise die Inhibition der Proliferation der T-Helferzellen synergistisch steigert, so daß auf diese Weise Transplantationsabstoßungen vermieden werden. Es zeigt sich, daß bei einem üblicherweise verwendeten in vitro Testsystem für die immunologische Histokompatibilität zweier Individuen (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR, Selected Methods in Cellular Immunology, Mishell, B.B., Shiigi S.M. eds. WH Freeman and Company, San Francisco 1980) die gleichzeitige Zugabe zweier monoklonaler Antikörper (Anti-CD4, Anti-IL-2 Rezeptor) synergistisch die Eymphozytenproliferation hemmt. Die wirksame Dosis dieser Antikörperkombination ist damit überraschenderweise wesentlich geringer als die wirksame Dosis der Antikörper, wenn sie einzeln eingesetzt werden. Weiterhin wurde überraschenderweise festgestellt, daß bei der Kombination von Anti-IL2R α -Antikörpern mit Anti-CD4-Antikörpern eine bis zu 96%ige Hemmung der MLR erzielt werden kann. Bei Verwendung von Anti-IL2R α -Antikörpern oder Anti-CD4-Antikörpern allein wird dagegen selbst bei Konzentrationen von 30 μ g/ml keine stärkere Hemmung als 70% erreicht. Bei der Kombination von Anti-IL2R β -Antikörpern mit Anti-CD4-Antikörpern kann ebenfalls überraschenderweise eine bis zu 96%ige Hemmung der MLR erzielt werden.

Der erfindungsgemäße und überraschende Synergismus wird nur dann festgestellt, wenn ein für sich alleine bereits stark inhibierender Anti-IL2R α -oder Anti-IL2R β -MAK in Kombination mit einem Anti-CD4-MAK verwendet wird. Verwendet man hingegen beispielsweise einen nicht bzw. nur schwach inhibierenden Anti-IL2R α -MAK, so wurde in Kombination mit einem für sich alleine bereits stark inhibierenden Anti-CD4-MAK keine verstärkte suppressive Wirkung gegenüber der alleinigen Verwendung des Anti-CD4-MAK festgestellt.

Bei einer Kombination von Anti-CD4-MAK und Anti-IL2R α -MAK werden für einen optimalen synergistischen Effekt vorzugsweise die beiden Antikörper (a) und (b) in einem molaren Verhältnis von 1:10 bis 10:1 verwendet. Besonders bevorzugt beträgt das molare Verhältnis der Antikörper (a) und (b) von 1:5 bis 5:1, am meisten bevorzugt von 3:10 bis 3:1. Bei Verwendung der Kombination Anti-CD4-MAK und Anti-IL2R β -MAK wird vorzugsweise ein molares Verhältnis der Antikörper (a) und (b) von 1:1000 bis 10:1 gewählt. Die erfindungsgemäße Antikörperzusammensetzung kann sowohl einen als auch mehrere Anti-CD4-Antikörper und sowohl einen als auch mehrere Anti-IL2R α - oder Anti-IL2R β -Antikörper enthalten, wobei sich bei Verwendung von mehreren Antikörpern einer Spezifität das molare Verhältnis immer jeweils auf die Summe aller Antikörper einer Spezifität bezieht.

Weiterhin wurde festgestellt, daß für die erfindungs-

gemäße Verwendung die Anwendung der beiden Antikörper zwar gemeinsam, aber nicht unbedingt gleichzeitig erfolgen muß, um den synergistischen Effekt zu zeigen. Unter dem Begriff "gemeinsamen Anwendung" ist im Sinne der vorliegenden Erfindung zu verstehen, daß auch eine gewisse zeitliche Versetzung bei der Verabreichung beider Antikörper toleriert werden kann. Es ist jedoch erforderlich, daß bei Verabreichung des zweiten Antikörpers die Wirksamkeit des zuerst verabreichten Antikörpers noch nicht deutlich nachgelassen haben darf. In der Praxis kann eine derartige in Frage kommende zeitliche Versetzung etwa bis zu 12 Stunden betragen.

Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Antikörperkombination ist ihre hohe Spezifität. Da Anti-IL2R α -oder Anti-IL2R β -Antikörper insbesondere an die aktivierten T-Symphozyten binden und lediglich die Anti-CD4-Antikörper an die Gesamtheit aller T-Helferzellen binden, wird durch die erfindungsgemäße Kombination dieser Antikörper in den erfindungsgemäß geringen Mengen die allgemeine Immunreaktion nur unwesentlich unterdrückt.

Die als Komponenten der erfindungsgemäßen Antikörperzusammensetzung geeigneten Antikörper können murine, humane, chimärisierte oder humanisierte Antikörper oder Antikörperfragmente sein. Vorzugsweise verwendet man humane, chimärisierte oder humanisierte Antikörper oder derartige Antikörperfragmente, da auf diese Weise die Möglichkeit einer Immunreaktion gegen die verabreichten Antikörper möglichst gering gehalten wird. Chimärisierte oder humanisierte Antikörper im Sinne der vorliegenden Erfindung sind nicht-humane Antikörper z. B. murinen Ursprungs, bei denen mittels bekannter gentechnologischer Methoden murine Sequenzen durch humane Sequenzen ersetzt worden sind. Bei den chimärisierten Antikörpern wird dabei nur die konstante Region des Antikörpers durch eine entsprechende humane Region ersetzt, während bei humanisierten Antikörpern die CDR-Regionen (complementary-determining regions) von humanen V-Regionen für die leichte und die schwere Kette eines Antikörpers durch die CDR-Regionen eines murinen oder anderen Nager-Antikörpers ausgetauscht werden können, so daß der humanisierte Antikörper bis auf die CDR-Regionen einem humanen Antikörper entspricht. Ebenfalls geeignet für das erfindungsgemäße Verfahren sind Antikörperfragmente, z. B. Fab- oder F(ab)₂-Antikörperfragmente, die nach Standardmethoden gewonnen werden können.

Eine genaue Beschreibung von geeigneten Anti-IL2R α -Antikörpern findet man in der DE 40 28 955.9. Anti-CD4-Antikörper sind in Eur.J.Immunol. 18 (1987) 495 beschrieben. Eine Beschreibung von geeigneten Anti-IL2R β -Antikörpern findet man in Takeshita, T., Goto, Y., Tada, K., Nagata, K., Asao, H., Sugamura, K.: J.Exp.Med. 169 (1989) 1323; Tsudo, M., Kitamura, F., Mijasaka, M.: Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86 (1989) 1982 und Niguma, T., Sakagami, K., Kawamura, T., Haisa, M., Fujiwara, T., Kusaka, S., Uda, M., Orita, K.: Transplantation 52 (1991) 296 – 302.

Besonders geeignet ist eine Kombination von Anti-CD4- und Anti-IL2R α - oder Anti-IL2R β -Antikörpern, deren Sequenzen für die variablen Regionen der leichten bzw. schweren Ketten in den beiliegenden Sequenzprotokollen beschrieben sind. SEQ ID NO. 1 und 2 zeigen Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen des Anti-CD4-Antikörpers MT 15.1, SEQ ID NO. 3 und 4 zeigen Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen des Anti-

CD4-Antikörpers MT 3.10, SEQ ID NO. 5 und 6 zeigen Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen des Anti-IL2R α -Antikörpers MAK 179. SEQ ID No. 9 und 10 zeigen Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen des Anti-IL2R β -Antikörpers A41. Während sich die zuvor genannten Antikörper zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung eignen, wurde dagegen festgestellt, daß der alleine nur schwach inhibitorisch wirkende Anti-IL2R α -Antikörper M-215 (SEQ ID. 7 und 8) in Kombination mit einem stark inhibierenden Anti-CD4-Antikörper keinen synergistischen Effekt zeigt. Geeignete konstante Regionen (murin oder human) für diese Antikörper sind beschrieben in: Sequences of proteins of immunological interest; E. Kabat, T. Wu, M. Reid-Miller, H. Perry and K. Gottesman, U.S. Department of Health and Human Services, 1987, p. 282–325. Die Fusion der Gene für die konstanten Regionen mit den Genen für die variablen Regionen kann mittels Standard-Klonierungstechniken der Molekularbiologie erfolgen.

Weiterhin ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Arzneimittel, das aus Komponenten (1) und (2) besteht, wobei die beiden Komponenten gemeinsam zu verabreichen sind, aber getrennt formuliert sein können, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die Komponente (1) einen für sich alleine stark inhibierenden monoklonalen Anti-CD4-Antikörper (a) als Wirkstoff und die Komponente (2) einen für sich alleine stark inhibierenden monoklonalen Anti-IL2R α - oder Anti-IL2R β -Antikörper (b) als Wirkstoff enthält, gegebenenfalls mit üblichen pharmazeutischen Hilfs-, Verdünnungs-, Träger- und Füllstoffen. Bei Verwendung eines Anti-IL2R α -Antikörpers als Wirkstoff der Komponente (2) ist das molare Verhältnis der beiden Antikörper der Komponenten (1) und (2) im Arzneimittel vorzugsweise von 1:10 bis 10:1. Besonders bevorzugt beträgt das molare Verhältnis der beiden Antikörper von 1:5 bis 5:1, am meisten bevorzugt von 3:10 bis 3:1. Verwendet man hingegen einen Anti-IL2R β -Antikörper als Wirkstoff der Komponente (2), dann ist das Verhältnis der beiden Antikörper der Komponenten (1) und (2) vorzugsweise von 1:1000 bis 10:1.

Wie bereits oben ausgeführt, sind die beiden Komponenten des erfindungsgemäßen Arzneimittels gemeinsam zu verabreichen, wobei der Begriff "gemeinsam" jedoch nicht unbedingt gleichzeitig bedeuten muß. Daher ist klar, daß die beiden Komponenten des erfindungsgemäßen Arzneimittels getrennt formuliert sein können. Die Formulierung der Antikörper erfolgt mittels Standardmethoden, z. B. in intravenös verabreichbaren physiologischen Lösungen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörperzusammensetzung oder des erfindungsgemäßen Arzneimittels bei einer immunsuppressiven Therapie, insbesondere bei einer Therapie zur Unterdrückung einer Immunreaktion nach Organ- oder Gewebetransplantation und Autoimmunerkrankungen.

Bei einem derartigen Behandlungsverfahren wird ein erfindungsgemäßes Arzneimittel verabreicht, das die Kombination eines Anti-CD4- und eines Anti-IL2R α - oder Anti-IL2R β -Antikörpers enthält. Bei einem derartigen therapeutischen Verfahren ist es überraschenderweise möglich, die Menge der verwendeten Antikörper gegenüber dem getrennten Einsatz der MAKs um den Faktor 10 herabzusetzen. Bei den verschiedenen in vivo Transplantationsmodellen werden MAKs gegen Oberflächenstrukturen bei einer Konzentration von 1 bis

5 mg/kg Körpergewicht (täglich für 10 bis 14 Tage) eingesetzt. Bei einer erfindungsgemäßen Kombination Anti-CD4 plus Anti-IL2R α bzw. Anti-CD4 plus Anti-IL2R β könnte die effektive Dosis auf 100 bis 200 µg/kg herabgesetzt werden.

Folgende Antikörper wurden bei der ECACC, Public Health Laboratory Service, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP 5 0JG, Großbritannien hinterlegt: Anti CD4 MAK MT 15.1 unter der Bezeichnung Clone 15-1/P3/14 (ECACC 90090705), Anti CD4 MAK MT 3.10 unter der Bezeichnung Clone 3.101/sB10 (ECACC 90090702) und Anti IL2R α MAK 179 unter der Bezeichnung 3G10/179 (ECACC 90071905).

Der monoklonale Anti IL2R β -Antikörper A41 wurde unter der Bezeichnung MAK <-IL-2R> M-A23A41 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-3300 Braunschweig, am 30.07.1991 unter der Nr. DSM ACC 2015 hinterlegt.

Die folgenden Beispiele sollen in Verbindung mit den Sequenzprotokollen SEQ ID NO. 1 bis NO. 10 die Erfindung weiter verdeutlichen.

SEQ ID NO. 1 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der leichten Kette des Anti-CD4-Antikörpers MT 15.1,

SEQ ID NO. 2 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der schweren Kette des Anti-CD4-Antikörpers MT 15.1,

SEQ ID NO. 3 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der leichten Kette des Anti-CD4-Antikörpers MT 3.10,

SEQ ID NO. 4 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der schweren Kette des Anti-CD4-Antikörpers MT 3.10,

SEQ ID NO. 5 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der leichten Kette des Anti-IL2R α -Antikörpers MAK 179,

SEQ ID NO. 6 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der schweren Kette des Anti-IL2R α -Antikörpers MAK 179,

SEQ ID NO. 7 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der leichten Kette des Anti-IL2R α -Antikörpers MAK M-215,

SEQ ID NO. 8 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der schweren Kette des Anti-IL2R α -Antikörpers MAK M-215,

SEQ ID NO. 9 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der leichten Kette des Anti-IL2R β -Antikörpers MAK A41 und

SEQ ID NO. 10 zeigt die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der schweren Kette des Anti-IL2R β -Antikörpers MAK A41.

Messung der Inhibition der Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) durch Antikörper

Die Mixed Lymphocyte Reaction (gemischte Lymphozyten Kultur) basiert auf der Eigenschaft von T-Lymphozyten, nach Erkennen von Fremdanitigenen in vitro verstärkt zu proliferieren. Fremdanitigenen können Bakterien und Viren sein, aber auch Transplantationsantigene auf fremdem Gewebe oder Zellen. Zur Induktion der T-Zell-Proliferation von durch Plasmaphorese gewonnenen peripheren Blut-Lymphozyten (PPBL) wurde die humane Lymphozyten-Linie RPMI 1788 (ATCC CLL156) verwendet. Durch Behandlung mit Mitomycin C wurde diese Zelllinie in ihrer Eigenproliferation vollständig blockiert. In der MLR proliferieren also nur die T-Lymphozyten der PPBL. Die Aktivierung der T-Lymphozyten kann durch Zugabe von immunsuppressiven Substanzen komplett inhibiert werden.

Die Durchführung der MLR erfolgt in Anlehnung an Selected Methods in Cellular Immunology Mishell B.B., Shiigi S.M. eds. WH Freeman and Company San Francisco (1980).

Medium (RPMI 1640 komplett)

440 ml RPMI 1640 (Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 209 945)

50 ml fötales Kälberserum (FKS) (Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 210 471)

5 ml Glutaminlösung, 200 mmol/l (Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 210 277)

5 ml Vitaminlösung (1%) (Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 210 307) enthaltend

1 ml Penicillin (50 000) und Streptomycin (50 mg) (Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 210 404) in RPMI 1640

Vitaminlösung (Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 210 307):

	mg/100 ml
Ca—D(+)—Pantothenat	10,0
Cholinchlorid	10,0
Folsäure	10,0
meso-Inositol	20,0
Nicotinsäureamid	10,0
Pyridoxal · HCl	10,0
Riboflavin	1,0
Thiamin · HCl	10,0

PPBL-Zellen: Aus Lymphozytenkonzentrat (gewonnen durch Plasmaphorese, Bayerisches Rotes Kreuz München) wurden die Lymphozyten durch Dichtezentrifugation mittels Lymphozyten-Trennmedium (Boehringer Mannheim, Katalog Nr. 295 949) gewonnen. Nach zweimaligem Waschen der Zellen in RPMI 1640 komplett wurde ein Zelltitert von 10^6 /ml eingestellt.

RPMI 1788-Zellen: Humane Lymphozytenlinie (ATCC CCL 156; IgM-lambda Ketten sezernierend) RPMI 1788-Zellen (ATCC CCL 156) werden mit Mitomycin C behandelt. Dazu werden 10^7 Zellen/ml mit 50 µg Mitomycin (gelöst in 100 µl RPMI 1640 komplett) versetzt und 45 Minuten bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Danach werden die Zellen abzentrifugiert und 2 × mit RPMI 1640 (komplett) gewaschen.

Es wird ein Zelltitert von $1 \cdot 10^6$ /ml eingestellt.

Zur Durchführung der MLR werden 100 µl PPBL (10^5 -Zellen) in Medium, RPMI 1640 komplett, 100 µl RPMI 1788-Zellen (10^5 -Zellen) in Medium, RPMI 1640 komplett und 20 µl Probensubstanz (MAK 179 und/oder MAK M 15.1) in den in den Tabellen 1 bis 2b angegebenen Konzentrationen in Flachboden-Gewebe-kulturplatten (96 Vertiefungen, Fa. Nunc) gegeben. Es wird vier Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Ausmaß der Proliferation wird durch Einbau von radioaktivem Thymidin in die DNS quantifiziert. Dafür werden 0,5 µCi/Vertiefung Methyl-³H Thymidin (spezifische Aktivität 25 Ci/mmol, TRK 120, Amersham-Buchler, Braunschweig) in 25 µl Medium zugegeben. Die Zellen werden weitere 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Anschließend werden die Zellen mit einem Inotech-Harvester (Fa. Inotech, Wohlen, Schweiz) auf Glasfilterplatten geerntet. Mit dem Filter Counting System INB-384 (Inotech) wird die Radioaktivität der Filterplatten bestimmt. Aus dem Verhältnis der gemessenen Radioaktivität für einen Testansatz mit Probensubstanz zu einem Testansatz ohne Probensubstanz wird die prozentuale Inhibition, wie sie in den Tabellen 1, 2a und 2b angegeben ist, bestimmt. (Die Konzentrationsangaben in den Tabellen sind als Mengenangaben pro ml Testvolumen zu verstehen.)

Die folgende Tabelle 1 zeigt die Dosis-Wirkungskurve bei jeweils alleiniger Anwendung der monoklonalen Antikörper MAK 179 (Anti-IL2Rα-Antikörper) oder MT 3.10 bzw. MT 15.1 (Anti-CD4-Antikörper) in der allogen induzierten Lymphozyten Proliferation (MLR). Aus den Werten ist ersichtlich, daß die Hemmwirkungen der einzelnen Antikörper bei einer Konzentration von ca. 300 ng/ml einen Maximalwert zwischen 60 bis 70% erreichen. Durch weitere Zugabe desselben Antikörpers bis zu einer Konzentration von 30 000 ng/ml kann die Hemmwirkung nicht mehr verbessert werden.

Tabelle 1

Hemmung der MLR in Prozent gegenüber Kontrolle				
Konz. ng/ml	MAK 179	MT 3.10	MT 15.1	
1	4	9	5	
3	11	18	2	
10	28	26	24	
30	48	57	52	
100	58	58	54	
300	61	67	67	
1000	61	68	67	
3000	60	62	65	
10 000	61	68	70	
30 000	61	70	70	

Die folgende Tabelle 2a zeigt die Inhibition der allogen induzierten Lymphozyten Proliferation (MLR) durch Kombination von MAK 179 und MT 3.10. Überraschenderweise wurde gefunden, daß durch gemeinsame Anwendung beider Antikörper eine sehr deutliche Verbesserung der Hemmwirkung eintritt. Bereits bei Einsatz von jeweils 100 ng/ml der beiden Antikörper wird eine fast vollständige Inhibition der allogen induzierten Lymphozyten-Proliferation festgestellt.

9
Tabelle 2a

Konzentration in ng/ml MAK 179	MT 3.10	Inhibition %
1	—	0
10	—	23
100	—	53
—	1	0
—	10	19
—	100	43
1	1	0
10	1	14
100	1	46
1	10	29
10	10	45
100	10	74
1	100	39
10	100	69
100	100	92

Die folgende Tabelle 2b zeigt die Inhibition der allo- gen induzierten Lymphozyten-Proliferation (MLR) durch Kombination von MAK 179 und MT 15.1. Man findet bereits bei Einsatz von jeweils 100 ng/ml der beiden Antikörper eine fast vollständige Inhibition der allo- gen induzierten Lymphozyten-Proliferation.

Tabelle 2b

Konzentration in ng/ml MAK 179	MT 15.1	Inhibition %
1 ^{a)}	—	0
10	—	23
100	—	53
—	1	0
—	10	18
—	100	53
1	1	1
10	1	25
100	1	62
1	10	16
10	10	48
100	10	86
1	100	28
10	100	64
100	100	96

Vergleichsbeispiel

Es wurde auch die Wirkung der Kombination eines alleine nur schwach inhibierenden Anti-IL2R α -Antikörpers (M-215) mit den stark inhibitorisch wirksamen Anti-CD4-Antikörpern 3.10 bzw. 15.1 getestet. Die Testdurchführung erfolgte, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3a und 3b dargestellt.

10
Tabelle 3a

Konzentration in ng/ml M-215	MT 3.10	Inhibition %
10 000	—	20
—	100	43
10 000	1	18
10 000	10	31
10 000	100	40

Tabelle 3b

Konzentration in ng/ml M-215	MT 15.1	Inhibition %
10 000	—	20
—	100	44
10 000	1	19
10 000	10	26
10 000	100	45

Aus den Tabellen 3a und 3b ist ersichtlich, daß eine Kombination der Antikörper M-215 und MT 3.10 bzw. M-215 und MT 15.1 auch bei extrem hohen Konzentrationen keinen synergistischen Effekt zeigt.

Beispiel 2

Es wurde die Dosis-Wirkungskurve des alleine stark inhibierenden Anti-IL2R β -Antikörpers A41 alleine und in Kombination mit den bereits in Beispiel 1 getesteten stark inhibierenden Anti-CD4-Antikörpern MT3.10 und MT 15.1 untersucht. Die Testdurchführung erfolgte gemäß Beispiel 1. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4a und 4b beschrieben.

Tabelle 4a

Konzentration in ng/ml MAK A 41	MT 3.10	Inhibition %
100	—	11
1000	—	26
10 000	—	50
—	1	4
—	10	31
—	100	60
100	1	8
1000	1	32
10 000	1	60
100	10	48
1000	10	70
10 000	10	85
100	100	64
1000	100	76
10 000	100	96

Tabelle 4b

Konzentration in ng/ml MAK A 41	MT 15.1	Inhibitor %	
100	—	11	5
1000	—	26	
10 000	—	50	
—	1	0	10
—	10	34	
—	100	55	
100	1	27	
1000	1	39	15
10 000	1	49	
100	10	48	
1000	10	70	
10 000	10	80	
100	100	59	20
1000	100	78	
10 000	100	92	

Aus den Tabellen 4a und 4b ist ersichtlich, daß eine Kombination der Antikörper A41 und MT3.10 bzw. A41 und MT15.1 eine synergistische Wirkung gegenüber einer alleinigen Verabreichung der Antikörper zeigt.

Patentansprüche 30

1. Synergistisch wirkende Antikörperzusammensetzung zur Verbesserung der Immunsuppression, **dadurch gekennzeichnet** daß sie

a) mindestens einen für sich alleine bereits stark inhibierenden monoklonalen Anti-CD4-Antikörper und

b) mindestens einen für sich alleine bereits stark inhibierenden monoklonalen Anti-IL2R α - oder Anti-IL2R β -Antikörper

wobei ein stark inhibierender Antikörper bei einer Konzentration von 10 000 ng/ml die allogen induzierte Lymphozytenproliferation in Abwesenheit anderer Antikörper zu mindestens 40% hemmt.

2. Antikörperzusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Antikörper (b) mindestens einen Anti-IL2R α -Antikörper enthält, wobei das molare Verhältnis der Antikörper (a) und (b) von 1:10 bis 10:1 ist.

3. Antikörperzusammensetzung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis der Antikörper (a) und (b) von 1:5 bis 5:1 ist.

4. Antikörperzusammensetzung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis der Antikörper (a) und (b) von 3:10 bis 3:1 ist.

5. Antikörperzusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 — 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper (a) die in SEQ ID NO. 1 und 2 oder die in SEQ ID NO. 3 und 4 dargestellten Aminosäuresequenzen als variable Regionen der leichten bzw. schweren Kette aufweist.

6. Antikörperzusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 — 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper (b) die in SEQ ID NO. 5 und 6 dargestellten Aminosäuresequenzen als variable Regionen der leichten bzw. schweren Kette aufweist.

7. Antikörperzusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Antikörper (b)

mindestens einen Anti-IL2R β -Antikörper enthält, wobei das molare Verhältnis der Antikörper (a) und (b) von 1:1000 bis 10:1 ist.

8. Antikörperzusammensetzung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper (b) die in SEQ. ID NO. 9 und 10 dargestellten Aminosäuresequenzen als variable Regionen der leichten bzw. schweren Kette aufweist.

9. Antikörperzusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper (a) und (b) murine, humane, chimärisierte oder humanisierte Antikörper oder Antikörperfragmente sind.

10. Arzneimittel, das aus Komponenten (1) und (2) besteht, wobei die beiden Komponenten gemeinsam zu verabreichen sind, aber getrennt formuliert sein können, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente (1) einen für sich alleine stark inhibierenden monoklonalen Anti-CD4-Antikörper (a) als Wirkstoff und die Komponente (2) einen für sich alleine stark inhibierenden monoklonalen Anti-IL2R α - oder Anti-IL2R β -Antikörper (b) als Wirkstoff enthält, gegebenenfalls mit üblichen pharmazeutischen Hilfs-, Verdünnungs-, Träger- und Füllstoffen.

11. Arzneimittel nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente (2) einen für sich alleine stark inhibierenden monoklonalen Anti-IL2R α -Antikörper (b) als Wirkstoff enthält, wobei das molare Verhältnis der beiden Antikörper der Komponenten (1) und (2) im Arzneimittel von 1:10 bis 10:1 ist.

12. Arzneimittel nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis der beiden Antikörper von 1:5 bis 5:1 ist.

13. Arzneimittel nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis der beiden Antikörper von 3:10 bis 3:1 ist.

14. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper (a) die in SEQ ID NO. 1 und 2 oder die in SEQ ID NO. 3 und 4 dargestellten Aminosäuresequenzen als variable Regionen der leichten bzw. schweren Kette aufweist.

15. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper (b) die in SEQ ID NO. 5 und 6 dargestellten Aminosäuresequenzen als variable Regionen der leichten bzw. schweren Kette aufweist.

16. Arzneimittel nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente (2) einen für sich alleine stark inhibierenden monoklonalen Anti-IL2R β -Antikörper (b) als Wirkstoff enthält, wobei das molare Verhältnis der beiden Antikörper der Komponenten (1) und (2) im Arzneimittel von 1:1000 bis 10:1 ist.

17. Arzneimittel nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper (b) die in Seq. ID No. 9 und 10 dargestellten Aminosäuresequenzen als variable Regionen der leichten bzw. schweren Kette aufweist.

18. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 10 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper (a) und (b) murine, humane, chimärisierte oder humanisierte Antikörper oder Antikörperfragmente sind.

19. Verwendung einer Antikörperzusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder eines

Arzneimittels nach einem der Ansprüche 10 bis 18 bei einer immunsuppressiven Therapie, insbesondere bei der Therapie nach Organ- oder Gewebetransplantationen.

20. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels für eine immunsuppressive Therapie, insbesondere für die Therapie nach Organ- und Gewebetransplantationen, worin man ein aus Komponenten (1) und (2) bestehendes Arzneimittel bereitstellt, dessen beide Komponenten gemeinsam zu verabreichen sind, aber getrennt formuliert werden können, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente (1) einen stark inhibierenden monoklonalen Anti-CD4-Antikörper (a) als Wirkstoff und die Komponente (2) einen stark inhibierenden monoklonalen Anti-IL2R α - oder Anti-IL2R β -Antikörper (b) als Wirkstoff enthält, gegebenenfalls mit üblichen pharmazeutischen Hilfs-, Verdünnungs-, Träger- und Füllstoffen.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man als Antikörper (b) einen Anti-IL2R α -Antikörper verwendet, wobei das molare Verhältnis der beiden Antikörper der Komponenten (1) und (2) von 1:10 bis 10:1 ist.

22. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man als Antikörper (b) einen Anti-IL2R β -Antikörper verwendet, wobei das molare Verhältnis der beiden Antikörper der Komponenten (1) und (2) von 1:1000 bis 10:1 ist.

23. Verfahren zur immunsuppressiven Therapie, insbesondere für die Therapie nach Organ- und Gewebstransplantationen, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Arzneimittel nach einem der Ansprüche 10 bis 18 verabreicht.

Hierzu 10 Seite(n) Zeichnungen

35

40

45

50

55

60

65

SEQ ID NO: 1 (Leichte Kette Klon 151, anti CD4 MAK MT 15.1)

ART DER SEQUENZ: Nucleotidsequenz mit entsprechendem Protein

SEQUENZLAENGE: 381 Basenpaare

MERKMALE: aa -20 (Met) Start der Signalsequenz
 aa 1 (Asp) Beginn der V-Region
 von aa 96 (Tyr) bis aa 107 (Lys) J2-Region

ATG	ATG	TCC	TCT	GCT	CAG	TTC	CTT	GGT	CTC	CTG	TTG	CTC	TGT	TTT	CAA	48
Met	Met	Ser	Ser	Ala	Gln	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Cys	Phe	Gln		
-20					-15				-10					-5		
GGT	ACC	AGA	TGT	GAT	ATC	CAG	ATG	ACA	CAG	ACT	ATA	TCC	TCC	CTC	TCT	96
Gly	Thr	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Ser	
				1				5					10			
GCC	TCT	CTG	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	AGT	TGC	AGG	GCA	AGT	CAG	GAC	144
Ala	Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	
		15				20					25					
ATT	AAC	AAT	TAT	TTA	AGC	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCA	GAT	GGA	ACT	GTT	192
Ile	Asn	Asn	Tyr	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	
	30					35				40						
AAA	CTC	CTG	ATC	TAC	TAC	ACA	TCA	AGA	TTA	CAT	TCA	GGA	GTC	CCA	TCA	240
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
45				50					55					60		
AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGA	ACA	GAT	TAT	TCT	CTC	ACC	ATT	ACC	288
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	
				65					70					75		
AAC	CTG	GAG	CAA	GAA	GAT	GTT	GCC	ACT	TAC	TTT	TGC	CAA	CAG	GGT	AAT	336
Asn	Leu	Glu	Gln	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	
			80				85						90			
ACG	CTT	CCG	TAC	ACG	TTC	GGA	GGG	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	ATA	AAA		
Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys		
		95					100					105				

SEQ ID NO: 2 (Schwere Kette Klon 151; anti CD4 MAK MT 15.1)

ART DER SEQUENZ: Nucleotidsequenz mit entsprechendem Protein
SEQUENZLAENGE: 417 Basenpaare

MERKMALE: aa -19 (Met) Start der Signalsequenz
aa 1 (Gln) Beginn der V-Region
von aa 108 (Asp) bis aa 120 (Ser) J4-Region

ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTG CTT TTC CTG ATG GCA GCT GCC CAA AGT	48
Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser	
-15 -10 -5	
ATC CAA GCA CAG ATC CAG TTG GTG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG ACG	96
Ile Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Thr	
1 5 10	
CCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAT ACC TTC	144
Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
15 20 25	
ACA GAC TAT TCA ATA CAC TGG GTG AAG CAG GCT CCA GGG AAG GAT TTA	192
Thr Asp Tyr Ser Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Asp Leu	
30 35 40 45	
AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACT GAG ACT GGT GAG CCA ACA TAT GCA	240
Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala	
50 55 60	
GAT GAC TTC ACG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC AGC	288
Asp Asp Phe Thr Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser	
65 70 75	
ACT GTC TAT TTG CAG ATC AAC AAC CTC AAA AAT GAG GAC ACG TCT ACA	336
Thr Val Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ser Thr	
80 85 90	
TAT TTC TGT GCT ATT CAT TAC TAC GCC TAC GGG GAT CCT TTG GAC TAC	384
Tyr Phe Cys Ala Ile His Tyr Tyr Ala Tyr Gly Asp Pro Leu Asp Tyr	
95 100 105	
TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA	
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

SEQ ID NO: 3 (Leichte Kette Klon 310, anti CD4 MAK MT 3.10)

ART DER SEQUENZ: Nucleotidsequenz mit entsprechendem Protein

SEQUENZLAENGE: 393 Basenpaare

MERKMALE: aa -20 (Met) Start der Signalsequenz
 aa 1 (Asp) Beginn der V-Region
 von aa 101 (Thr) bis aa 111 (Lys) J1-Region

ATG	GAG	ACA	GAC	ACA	ATC	CTG	CTA	TGG	GTG	CTG	CTG	CTC	TGG	GTT	CCA	48
Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Ile	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Trp	Val	Pro		
-20					-15					-10				-5		
GGC	TCC	ACT	GGT	GAC	ATT	GTG	CTG	ACC	CAA	TCT	CCA	GCT	TCT	TTG	CCT	96
Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Pro	
			1		5					10						
ATG	TCT	CTA	GGG	CAG	AGG	GCC	ACC	ATC	TCC	TGC	AAG	GCC	AGC	CAA	AGT	144
Met	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	
	15				20					25						
CTT	GAT	TAT	GAT	GGT	GAT	AGT	TAT	ATG	AAC	TGG	TAC	CAA	CAG	AAA	CCA	192
Leu	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	
	.30				35					40						
GGA	CAG	CCA	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	TAT	GCT	GCA	TCC	AAT	CTA	GAA	TCT	240
Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	
45				50					55					60		
GGG	ATC	CCA	GCC	AGA	TTT	AGT	GGC	AGT	GGG	TCC	GGG	ACA	GAC	TTC	ACC	288
Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	
			65					70						75		
CTC	AAC	ATC	CAT	CCT	GTG	GAG	GAG	GAG	GAT	GCT	GCA	ACC	TAT	TAC	TGT	336
Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	
			80					85					90			
CAG	CAA	AGT	AGT	GAG	GAT	CCT	CCG	ACG	TTC	GGT	GGA	GGC	ACC	AAG	CTG	384
Gln	Gln	Ser	Ser	Glu	Asp	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	
		95				100						105				
GAA	ATC	AAA														
Glu	Ile	Lys														
	110															

SEQ ID NO: 4 (Schwere Kette Klon 310, anti CD4 MAK MT 3.10)

ART DER SEQUENZ: Nucleotidsequenz mit entsprechendem Protein
SEQUENZLAENGE: 411 Basenpaare

MERKMALE: aa -18 (Met) Start der Signalsequenz
aa 1 (Gln) Beginn der V-Region
von aa 107 (His) bis aa 118 (Ala) J3-Region

ATG	GAA	TGG	AGG	ATC	TTT	CTC	TTC	ATC	CTG	TCA	GGA	ACT	GCA	GGT	GTC	48
Met	Glu	Trp	Arg	Ile	Phe	Leu	Phe	Ile	Leu	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Val	
			-15						-10				-5			
CAC	TCC	CAG	GTT	CAC	CTG	CAG	CAG	TCT	GGA	CCT	GAG	CTG	GTG	AAG	CCT	96
His	Ser	Gln	Val	His	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	
		1				5					10					
GGG	CCT	TCA	GTG	AAG	ATG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGA	TAC	ACA	TTC	ACT	144
Gly	Pro	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	
15					20				25					30		
GAC	TAT	GTT	GTA	AGT	TGG	ATG	CAA	CAG	AGA	ACT	GGA	CAG	GTC	CTT	GAG	192
Asp	Tyr	Val	Val	Ser	Trp	Met	Gln	Gln	Arg	Thr	Gly	Gln	Val	Leu	Glu	
				35					40					45		
TGG	ATT	GGA	GAG	ATT	TAT	CCT	GGA	AGT	GGT	AGT	GCT	TAT	TAC	AAT	GAA	240
Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Tyr	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Asn	Glu	
				50					55					60		
AAA	TTC	AAG	GGC	AAG	GCC	ATA	CTG	ACT	GCA	GAG	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	288
Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Ile	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	
			65					70					75			
GCC	TAC	ATG	GAG	TTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TTT	336
Ala	Tyr	Met	Glu	Phe	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Phe	
		80					85					90				
TTC	TGT	GCA	AGA	CGG	GGG	GAT	GGT	TCC	CTC	GGC	TTT	GCT	CAC	TGG	GGC	384
Phe	Cys	Ala	Arg	Arg	Gly	Asp	Gly	Ser	Leu	Gly	Phe	Ala	His	Trp	Gly	
	95				100						105					
CAA	GGG	ACT	CTG	GTC	ACT	GTC	GCT	GCA								
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Ala								
110					115											

SEQ ID NO: 5 (Leichte Kette Klon 179, anti IL2R MAK 179)

ART DER SEQUENZ: Nucleotidsequenz mit entsprechendem Protein
SEQUENZLÄNGE: 381 Basenpaare

MERKMALE: aa -20 (Met) Start der Signalsequenz
aa 1 (Asp) Beginn der V-Region
von aa 96 (Arg) bis aa 107 (Lys) J1-Region

ATG	ATG	GTC	CTT	GCT	CAG	TTT	CTT	GCA	TTC	TTG	TTG	CTT	TGG	TTT	CCA	48
Met	Met	Val	Leu	Ala	Gln	Phe	Leu	Ala	Phe	Leu	Leu	Leu	Trp	Phe	Pro	
-20					-15					-10					-5	
GGT	GCA	AGA	TGT	GAC	ATC	CTG	ATG	ACC	CAA	TCT	CCA	TCC	TCC	ATG	TCT	96
Gly	Ala	Arg	Cys	Asp	Ile	Leu	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Met	Ser	
				1				5					10			
GTA	TCT	CTG	GGA	GAC	ACA	GTC	AGC	ATC	ACT	TGC	CAT	GCA	AGT	CAG	GGC	144
Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Thr	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	His	Ala	Ser	Gln	Gly	
		15					20					25				
ATC	AGA	AGT	AAT	ATA	GTG	TGG	TTG	CAG	CAG	AAA	CCA	GGG	AAA	TCA	TTT	192
Ile	Arg	Ser	Asn	Ile	Val	Trp	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Phe	
	30					35					40					
AGG	GGC	CTG	ATC	TAT	CAT	GGA	ACC	AAG	TTG	GAA	GAT	GGA	GTT	CCA	TCA	240
Arg	Gly	Leu	Ile	Tyr	His	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	
45					50					55				60		
AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGA	TCT	GGA	GCA	GAT	TAT	TCT	CTC	ACC	ATC	AGC	288
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	
				65					70					75		
AGC	CTG	GAA	TCT	GAA	GAT	TTT	GCA	GAC	TAT	TAT	TGT	GTA	CAG	TAT	GCT	336
Ser	Leu	Glu	Ser	Glu	Asp	Phe	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Val	Gln	Tyr	Ala	
			80					85					90			
CAG	TTT	CCT	CGG	ACG	TTC	GGT	GGA	GGC	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAA		
Gln	Phe	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys		
		95					100						105			

SEQ ID NO: 6 (Schwere Kette Klon 1/9, anti IL2R MAK 179)

ART DER SEQUENZ: Nucleotidsequenz mit entsprechendem Protein

SEQUENZLAENGE: 396 Basenpaare

MERKMALE: aa -19 (Met) Start der Signalsequenz
 aa 1 (Asp) Beginn der V-Region
 von aa 99 (Asp) bis aa 102 (Asn) D-Region
 von aa 103 (Trp) bis aa 113 (Ala) J3-Region

ATG	GAC	TCC	AGG	CTC	AAT	TTA	GTT	TTC	CTT	GTC	CTT	ATT	TTA	AAA	GGT	48
Met	Asp	Ser	Arg	Leu	Asn	Leu	Val	Phe	Leu	Val	Leu	Ile	Leu	Lys	Gly	
				-15						-10					-5	
GTC	CAG	TGT	GAT	GTG	CAG	CTG	GTG	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTA	GTG	CAG	96
Val	Gln	Cys	Asp	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	
			1				5					10				
CCT	GGA	GGG	TCC	CGG	AAA	CTC	TCC	TGT	GTT	GCC	TCT	GGA	TTC	ACT	TTC	144
Pro	Gly	Gly	Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	
	15					20					25					
AGT	ACC	TTT	GGA	ATG	CAC	TGG	GTT	CGT	CAG	GCT	CCA	GAG	AAG	GGG	CTG	192
Ser	Thr	Phe	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	
	30				35				40					45		
GAG	TGG	GTC	GCA	TAC	ATT	AGT	AGT	GGC	AGT	GGT	ACC	ATC	TAC	TAT	GCA	240
Glu	Trp	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	
				50				55					60			
GAC	ACA	GTG	AAG	GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAT	CCC	AAG	AAT	288
Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Pro	Lys	Asn	
			65					70					75			
ACC	CTG	TTC	CTG	CAA	ATG	ACC	AGT	CTA	AGG	TCT	GAG	GAC	ACG	GCC	ATG	336
Thr	Leu	Phe	Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	
		80					85					90				
TAT	TAC	TGT	GCA	AGA	GAT	TGG	ATG	AAC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACT	CTG	GTC	384
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Trp	Met	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
	95					100					105					
ACT	GTC	TCT	GCA													
Thr	Val	Ser	Ala													

SEQ ID NO: 7 (Leichte Kette Klon 215, anti IL2Rα MAK M-215)

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz mit entsprechendem Protein
SEQUENZLAENGE: 435 Basenpaare

MERKMALE: aa -22 (Met) : Start der Signalsequenz
aa 1 (Lys) : Beginn der V-Region
von aa 95 (Phe) bis aa 106 (Lys) J4-Region
ab aa 107 (Arg) : Beginn der C-Region

ATG	GAT	TTT	CAA	GTG	CAG	ATT	TTC	AGC	TTC	CTG	CTA	ATC	AGT	GCT	TCA	48
Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser	
		-20					-15					-10				
GTC	ATA	ATG	TCC	AGA	GGC	AAA	ATT	GTT	CTC	TCC	CAG	TCT	CCA	GCA	ATC	96
Val	Ile	Met	Ser	Arg	Gly	Lys	Ile	Val	Leu	Ser	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	
	-5					1				5					10	
CTG	TCT	GCA	TCT	CCA	GGG	GAG	AAG	GTC	ACA	ATG	ACT	TGC	AGG	GCC	AGC	144
Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	
				15					20					25		
TCA	AGT	ATA	AGT	TAC	ATG	CAC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	CCA	GGA	TCC	TCC	192
Ser	Ser	Ile	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	
			30					35					40			
CCC	AAA	CCC	TGG	ATT	CAA	GCC	ACA	TCC	AAC	CTG	GCT	TTT	GGA	GTC	CCT	240
Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Phe	Gly	Val	Pro	
		45					50					55				
TCT	CGC	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACC	TCT	TAC	TCT	CTC	ACA	ATC	288
Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	
	60					65					70					
AGC	AGA	GTG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT	TAT	TAC	TGC	CAG	CAG	TGG	336
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	
	75				80					85					90	
AGT	AGT	AAC	CCA	TTC	ACG	TTC	GGC	TCG	GGG	ACA	AAG	TTG	GAA	ATG	AAA	384
Ser	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Met	Lys	
				95					100					105		
CGG	GCT	GAT	GCT	GCA	CCA	ACT	GTA	TCC	ATC	TTC	CCA	CCA	TCC	AGT	GAG	432
Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	
			110					115					120			
CAG																
Gln																

SEQ ID NO: 8 (Schwere Kette Klon 215, anti IL2R α MAK M-215)

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz mit entsprechendem Protein
SEQUENZLAENGE: 549 Basenpaare

MERKMALE: aa -19 (Met) : Start der Signalsequenz
aa 1 (Gln) : Beginn der V-Region
von aa 98 (Thr) bis aa 104 (Ser) D-Region
von aa 105 (Trp) bis aa 119 (Ala) J3-Region
ab aa 120 (Ala) : Beginn der C-Region

ATG GCT GTG CTG GGG CTG CTT CTC TGC CTG GTG ACT TTC CCA AGC TGT	48
Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys	
-15 -10 -5	
GTC CCG TCC CAG GTG CAG CTG AAG GAG TCA GGG CCT GGC CTG GTG GCG	96
Val Pro Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala	
1 5 10	
CCC TCA CAG AGC CTG TCC ATC ACA TGC ACC GTC TCA GGG TTC TCA TTA	144
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu	
15 20 25	
AGT ACC TAT AGT GTA TAC TGG GTT CGC CAG CCT CCA GGA AAG GGT CTG	192
Ser Thr Tyr Ser Val Tyr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG CTG GGA GTG ATA TGG AGT GAT GGA AGC ACA ACC TAT AAT TCA	240
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Ser	
50 55 60	
ACT CTC AAA TCC AGA CTG ACC ATC AGC AAG GAC AAC TCC AAG AGT CAA	288
Thr Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln	
65 70 75	
GTT TTC TTA AAA GTG AAC AGT CTC CAA ACT GAT GAC ACA GCC ATG TAC	336
Val Phe Leu Lys Val Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr	
80 85 90	
TAC TGT GCC AGA ACC TAT GGT TAT GAC GGG TCC TGG CTT GCT TAC TGG	384
Tyr Cys Ala Arg Thr Tyr Gly Tyr Asp Gly Ser Trp Leu Ala Tyr Trp	
95 100 105	
GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA GCC AAA ACA ACA CCC CCA	432
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro	
110 115 120 125	
TCA GTC TAT CCA CTG GCC CCT GGG TGT GGA GAT ACA ACT GGT TCC TCC	480
Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser	
130 135 140	
GTG ACT CTG GGA TGC CTG GTC AAG GGC TAC TTC CCT GAG TCA GTG ACT	528
Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr	
145 150 155	
GTG ACT TGG AAC TCT GGA TCC	549
Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser	
160	

SEQ.ID.NO.: 9 (leichte Kette Klon A23A41, anti IL2RB MAK A41)

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz mit entsprechendem Protein

SEQUENZLÄNGE: 322 bp

MERKMALE: aa 1-96 V-Region

aa 97-107 J-Region

bp 322 erstes Basenpaar der C-Region

GAC	GTC	TTG	CTG	ACT	CAG	TCT	CCA	GCC	ATC	CTG	TCC	GTG	AGT	CCA	GGA	48
Asp	Val	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	
1				5					10					15		
GAA	AGA	GTC	AGT	TTC	TCC	TGT	AGG	GCC	AGT	CAG	AGC	ATT	GGC	ACA	AGC	96
Glu	Arg	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Ser	
		20						25					30			
ATA	CAC	TGG	TAT	CAG	CAA	AGA	ACA	AAT	GGT	CCT	CCA	AGG	CTT	CTC	ATA	144
Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Pro	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	
		35					40					45				
AAG	TAT	GCG	TCT	GAG	TCA	ATC	TCT	GGG	ATC	CCT	TCC	AGG	TTT	AGT	GGC	192
Lys	Tyr	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
	50					55				60						
AGT	GGA	TCA	GGG	ACA	GAT	TTT	ACT	CTT	AGC	ATC	AGC	AGT	GTG	GAG	TCT	240
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Ser	Val	Glu	Ser	
65				70					75					80		
GAA	GAT	ATT	GCA	GAT	TAT	TAC	TGT	CAA	CAA	ACT	AAT	AGC	TGG	CCA	ACC	288
Glu	Asp	Ile	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Asn	Ser	Trp	Pro	Thr	
				85				90						95		
ACG	TTC	GGA	GGG	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	ATT	AAA	C	322				
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys						
			100					105								

SEQ.ID.NO.: 10 (Schwere Kette Klon A23A41, anti 1L2R3 MAK A41)

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz mit entsprechendem Protein

SEQUENZLÄNGE: 355 bp

MERKMALE: aa 1-98 V-Region

aa 99-104 D-Region

aa 105-118 J-Region

bp 355 erstes Basenpaar der C-Region

GAG	GTC	CAG	CTG	CAA	CAG	TTT	GGA	GCT	GAA	TTG	GTG	AAG	CCT	GGG	ACT	48
Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Phe	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Thr	
1				5					10					15		
TCG	GTG	AAG	ATA	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAC	ATT	TTC	ACT	GAC	TAC	96
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Phe	Thr	Asp	Tyr	
			20					25					30			
AAC	ATG	GAC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGC	CAT	GGA	AAG	AGC	CTT	GAG	TGG	ATT	144
Asn	Met	Asp	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35					40					45				
GGA	GAT	ATT	GAT	CCT	AAC	TTT	GAT	AGT	TCC	AGT	TAC	AAC	CAG	AAG	TTC	192
Gly	Asp	Ile	Asp	Pro	Asn	Phe	Asp	Ser	Ser	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					
AAG	GGA	AAG	GCC	ACA	TTG	ACT	GTA	GAC	AAG	TCC	TCC	AAC	ACA	GCC	TAC	240
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr	
65					70				75					80		
ATG	GAG	CTC	CGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	ACT	GCA	GTC	TAT	TAC	TGT	288
Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85					90					95			
GCA	AGA	GGG	GGA	TTC	CCC	TAT	GGT	ATG	GAC	TAC	TGG	GGT	CAA	GGA	ACC	336
Ala	Arg	Gly	Gly	Phe	Pro	Tyr	Gly	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			100				105						110			
TCA	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	G		355								
Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
			115													